Archive of SID

اثر اسیدآمینه پرولین و امواج فراصوت بر کالوس‌زایی و جنین‌زایی بدنی از ریز نمونه میان‌گرهی ساقه در انگور رقم کندری

یوسف فرخ‌زاد[1*]، آیت اله رضایی[2]، یاور شرفی[3] و ایمان روح‌الهی[4]

1 و *- نویسنده مسئول و دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شاهد، تهران.

farrokhzadyusuf@gmail.com

2،3 و4: عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه شاهد، تهران.

هدف عمده‌ی پژوهش حاضر، بررسی اثر امواج فراصوت در چهار سطح زمانی (بدون تیمار، 60، 120، 240) و پرولین در چهار غلظت (بدون تیمار، 50، 100، 200 میکرومولار) بر جنین‌زایی و جوانه‌زنی جنین‌های بدنی انگور رقم کندری از ریز نمونه میان‌گرهی ساقه بود. ریز نمونه‌ها بعد از ضدعفونی در محیط MS کشت شدند و سپس کالوس‌های به‌دست‌آمده به محیط MS تکمیل‌شده با پرولین منتقل شدند. تیمار امواج فراصوت نیز در این مرحله اعمال شد. جنین‌های به‌دست‌آمده جهت جوانه‌زنی در محیط MS بدون اکسین کشت شدند و مجدداً تیمار صوت دهی در این مرحله نیز اعمال شد. شاخص‌هایی مانند فراوانی کالوس‌زایی، وزن تر و خشک کالوس، تعداد جنین در هر کالوس و درصد جوانه‌زنی جنین‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که امواج فراصوت و پرولین بر صفات موردمطالعه اثر معناداری در سطح یک درصد داشتند. به‌طورکلی، سطوح 50 و 100 میکرومولار پرولین و 60 و 120 ثانیه صوت‌دهی به ترتیب بیشترین اثر مثبت را بر اکثر شاخص‌ها داشتند.

کلیدواژه‌ها: امواج فراصوت، صوت‌دهی، پرولین، جنین‌زایی بدنی و جوانه‌زنی

مقدمه

جنین‌زایی بدنی ابزاری کارآمد برای تکثیر سریع، تراریخته کردن ژنتیکی، هیبریداسیون بدنی و تنوع سوماکلونال است (مارتینلی و گریبادو، 2001). جنین‌زایی بدنی باعث تولید گیاهانی دارای ثبات ژنتیکی و سیتولوژیکی می‌گردد (بنیسی و همکاران، 2004). اگر چه، جنین‌زایی بدنی در برخی از گونه‌های گیاهی ممکن است به طور خود به خودی رخ دهد، در انگور معمولا در محیط کشت درون شیشه‌ای و با استفاده بخشی از پیکره بدنی گیاه القا می‌گردد (کانتاراجا و گولگانوکار، 2003). در انگور بیشتر از ریزنمونه‌های اندام‌های زایشی جهت القا جنین‌زایی بدنی استفاده شده است اما با توجه به زمان کوتاه دسترسی به این ریز نمونه‌ها استفاده از ریزنمونه‌های رویشی مانند برگ و قسمت‌های میانگرهی ساقه مورد توجه قرار گرفته است (مارتینلی و گریبادو، 2001).

امواج فراصوت در فرکانس‌های صدا در محدوده‌ی غیر قابل شنیدن (20 تا 100 کیلوهرتز) به کار می‌روند (گابا و همکاران، 2006). اثر تحریکی این امواج را می‌توان به علت بالا بردن سرعت ملکول‌ها و افزایش فعالیت آنزیم‌ها توضیح داد. امواج فراصوت باعث اثر بر هورمون‌های درون‌زا و تغییر در نسبت‌های اکسین/ سیتوکینین و ایندول استیک اسید/ آبسزیک اسید می‌گردد. این امواج نفوذپذیری غشا را تغییر می‌دهند و موجب افزایش انتقال مواد می‌گردند. با توجه به آنچه گفته شد این امواج درکشت بافت گیاهی در تحریک باززایی، جوانه‌زنی بذر، انتقال DNA تولید متابولیت‌های ثانویه و ... به کار گرفته شده‌اند (رضایی و فرخ‌زاد، 1394). ماچیکووا و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران (2013) گزارش کردند که امواج فراصوت باعث افزایش میزان جوانه‌زنی بذرهای مصنوعی می‌شود. مشخص شده است که با جذب یون‌های نیتروژن و آمونیوم تغییراتی در pH محیط‌کشت اتفاق می‌افتد (نایدز، 1994). بنابراین، استفاده از سایر منابع نیتروژنی، مانند کازئین هیدرولازات و اسیدهای آمینه جهت بالابردن بازدهی جنین‌زایی بدنی مورد نظر بوده است (جمال محمود و همکاران، 1392). منوج و همکاران (2009) گزارش کردند که استفاده از اسید آمینه گلوتامین به میزان 0/68 میلی‌مولار باعث افزایش تولید جنین‌بدنی در گیاه گواوا گردید. به نظر می‌رسد موجود در اسیدهای آمینه در طی متابولیسم و سنتز پروتئین در مقایسه با منبع نیتروژن غیر آلی سریع‌تر وارد اسکلت کربنی می‌شود (لی، 1993). این مطالعه با هدف بررسی اثر امواج فراصوت و اسید آمینه پرولین برکالوس-زایی و جنین‌زایی بدنی در انگور رقم کندری انجام شد و لازم به ذکر است که این نخستین باری است که امواج فراصوت با هدف القا و جوانه‌زنی جنین‌های بدنی استفاده شده‌اند.

مواد و روش‌ها

ریزنمونه‌های میانگرهی ساقه انگور رقم "کندری"، که حالت علفی داشتند در اردیبهشت ماه سال 94 از باغ تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد جمع‌آوری شدند. ریز نمونه‌ها پس از ضدعفونی در محیط MS حاوی 0/1 میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، 1 میلی-گرم در لیتر BAP و 30 گرم ساکارز،کشت شدند و سپس کالوس‌های به‌دست آمده به محیط MS جنین‌زایی حاوی 1 میکرو مولار 2,4-D، 0/1 میکرومولار BAP تکمیل شده با پرولین در چهار غلظت (بدون تیمار، 50، 100، 200 میکرومولار) منتقل شدند. بعد از چند روز استقرار نمونه‌ها روی این محیط، تیمار امواج فراصوت با توان 2 وات و فرکانس 20 کیلو هرتز نیز در چهار سطح زمانی (بدون تیمار، 60، 120، 240) اعمال شد. بعد از دو ماه جنین‌های لپه‌ای روی این محیط مشاهده شدند. جنین‌های لپه‌ای به‌دست آمده جهت جوانه‌زنی به محیط MS حاوی 1 میلی‌گرم در لیتر BAP و بدون اکسین همراه کشت شدند و مجددا تیمار فراصوت اعمال شد. شاخص-هایی مانند فراوانی کالوس‌زایی، طول، ارتفاع، وزن تر و خشک کالوس، تعداد جنین در هر کالوس، درصد جوانه‌زنی جنین‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در 3 تکرار انجام شد. در این آزمایش، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار spss و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. همچنین جهت کشیدن نمودار-ها از نرم‌افزار Exel استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر پرولین و امواج فراصوت که در جدول (1) آورده شده است نشان می‌دهد که سطوح امواج فراصوت بر شاخص‌هایی همچون فراوانی کالوس‌زایی، وزن تر و خشک ، میانگین تعداد جنین در هر کالوس و درصد جوانه‌زنی جنین-ها اثر معنی‌داری در سطح 1٪ داشته است. نتایج جدول (1) نشان می‌دهد که سطوح تیمار پرولین بر همه شاخص‌ها اثر مثبتی در سطح 1٪ داشته است. همچنین نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل امواج فراصوت و اسید آمینه‌ی پرولین نیز بر روی بیشتر شاخص‌ها مثبت بود.

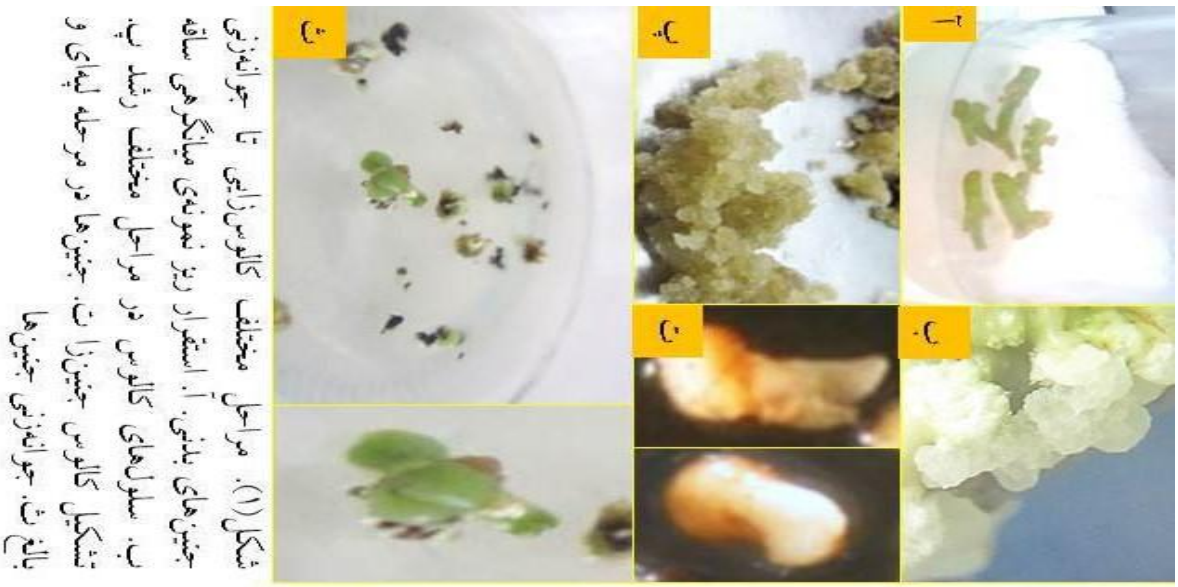
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1: تجزیه واریانس اثر اسید آمینه پرولین و امواج فراصوت بر صفات مورد بررسی در انگور رقم "کندری"

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		فراوانی کالوس-زایی	وزن تر	وزن خشک	میانگین تعداد جنین در هر کالوس	درصد جوانه‌زنی جنین‌ها
امواج فراصوت	3	3/50**	10/40**	0/009**	17/53**	4720/96**
پرولین	3	3/72**	3/90**	0/01**	16/41**	3672/96**
امواج فراصوت * پرولین	9	1/11**	1/68**	0/007**	5/48**	1753/78**
خطای آزمایشی	32	0/31	0/05	0/00	0/05	3/39
کل	47					

** معنی دار در سطح احتمال 1٪

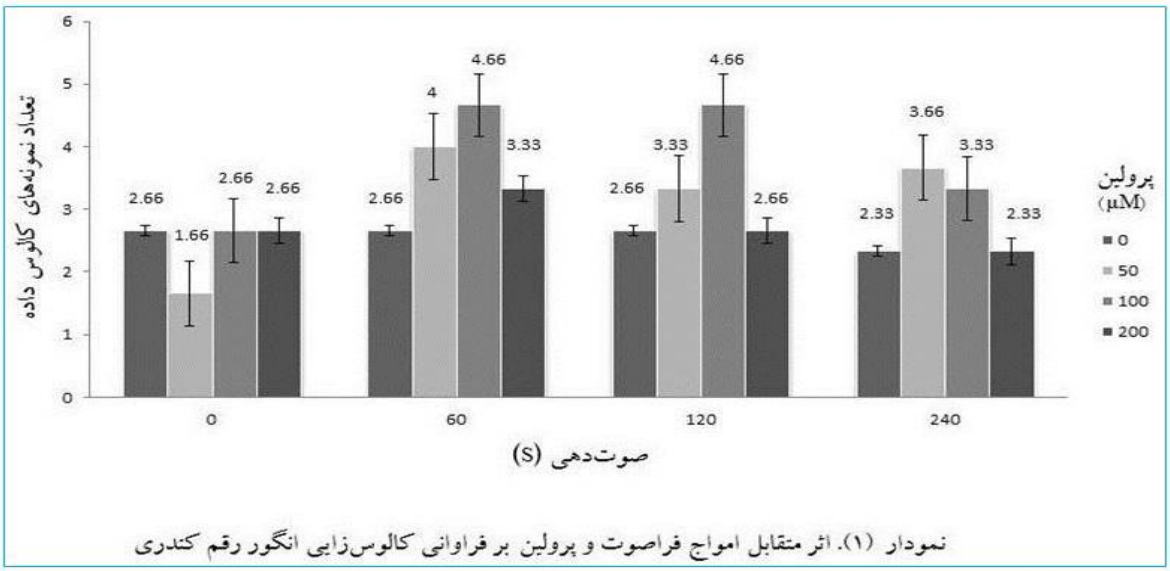


شکل (1). مراحل مختلف کالوس‌زایی تا جوانه‌زنی جنین‌های بادنی. آ. استقرار ریز نمونه‌ی میانگره‌ی ساقه ب. سلول‌های کالوس در مراحل مختلف رشد پ. تشکیل کالوس جنین‌زا ت. جنین‌ها در مرحله لپه‌ای و بالغ ث. جوانه‌زنی جنین‌ها

نمودار اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین (1) نشان می‌دهد که سطح 100 میکرو مولار پرولین به همراه سطوح صوت‌دهی به مدت 60 و 120 ثانیه بهترین سطوح تیماری از نظر فراوانی کالوس‌زایی بوده‌اند. با افزایش صوت‌دهی به نظر می‌رسد تا حدی کالوس‌زایی کاهش یافته است. اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر وزن تر کالوس (نمودار 2) بیان می‌کند که صوت‌دهی به مدت 120 ثانیه به همراه غلظت 50 و 100 میکرومولار پرولین به ترتیب بهترین اثر را بر وزن تر کالوس داشته‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

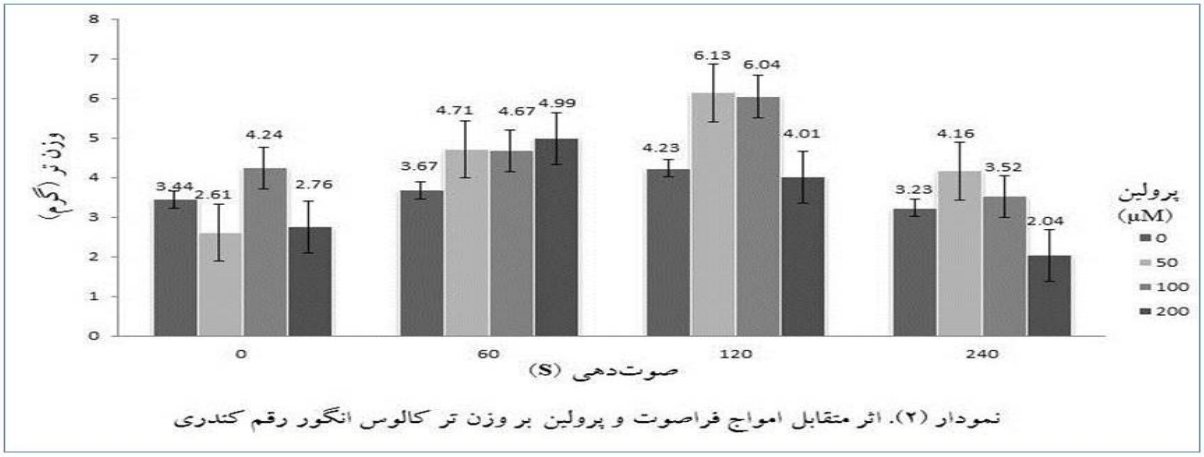


نمودار (۱). اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر فراوانی کالوس‌زایی انگور رقم کندری

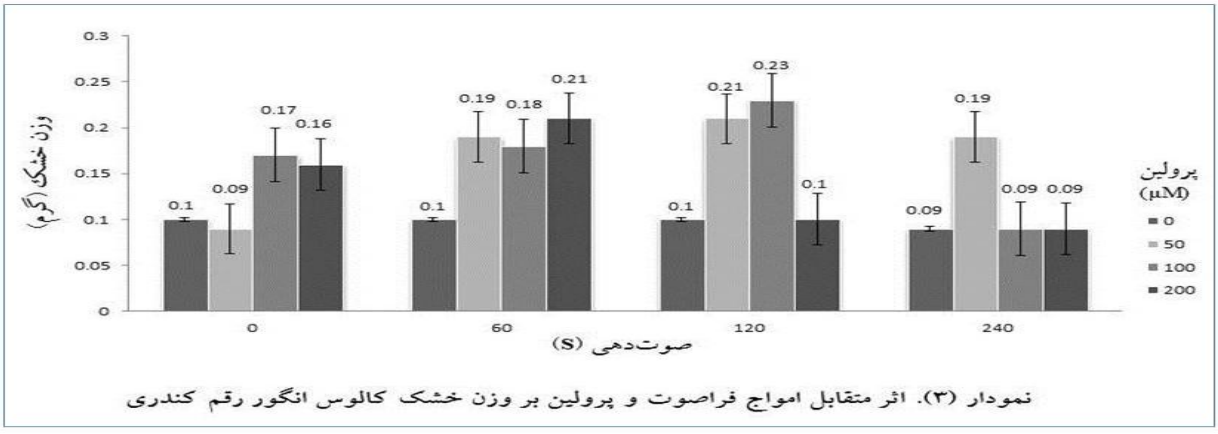
مقایسه میانگین اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر وزن خشک کالوس (نمودار 3) نشان می‌دهد که تیمار صوت‌دهی به مدت 120 ثانیه به همراه غلظت 100 و 50 پرولین به ترتیب بهترین اثر را بر افزایش وزن خشک کالوس گذاشته‌اند. نمودار اثر متقابل امواج فراصوت و اسیدآمینه‌ی پرولین بر تعداد جنین در هر کالوس(نمودار 4) نشان می‌دهد که تیمار صوت‌دهی 60 ثانیه و غلظت 50 میکرو مولار پرولین بهترین اثر را در تولید جنین داشته است. همچنین اثر متقابل امواج فراصوت و اسیدآمینه‌ی پرولین (نمودار 5) نشان می‌دهد که تیمار صوت‌دهی 120 ثانیه به همراه غلظت 100 پرولین بهترین اثر را بر جوانه‌زنی جنین‌ها (82 درصد) داشتند. به‌طورکلی، نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان می‌دهد که در تمام حالات نتایج بهتری نسبت به نمونه‌های بدون صوت‌دهی به دست آمد. نتایج ما با نتایج منوج و همکاران (2009) ، ماچیکووا و همکاران (2013) و جمال محمود و همکاران (1392) مطابقت دارد. با این وجود یا گزارش اوزکوم و تیپرداماز (2011) همخوانی ندارد. آنها گزارش کردند که افزودن پرولین به محیط‌کشت بساک‌های فلفل (Capsicum annuum L.) اثری بر تشکیل جنین ندارد و در فقدان پرولین پاسخ بهتری به‌دست می‌آید.

www.SID.ir

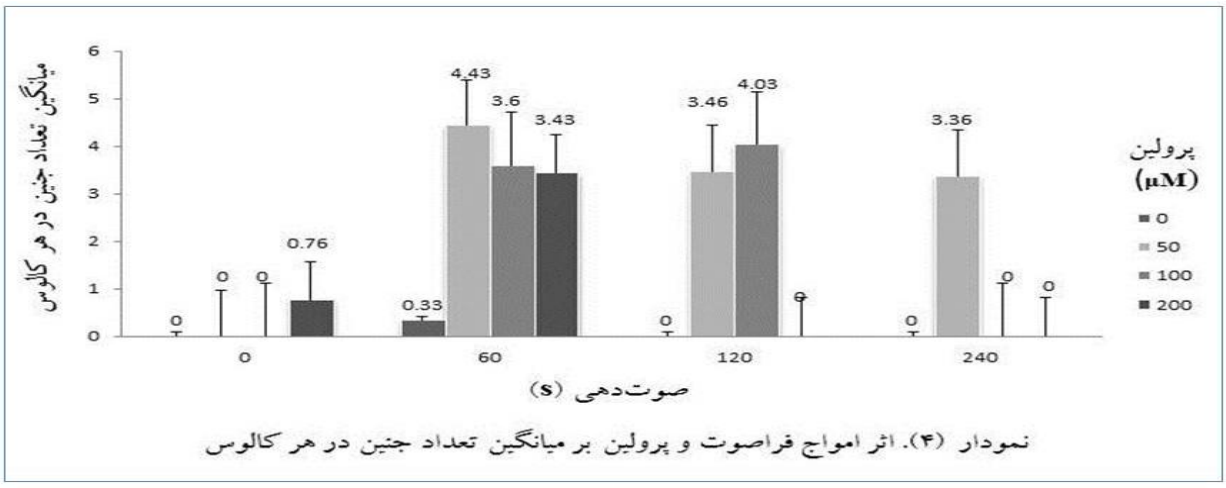
Archive of SID



نمودار (۲). اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر وزن تر کالوس انگور رقم کندری



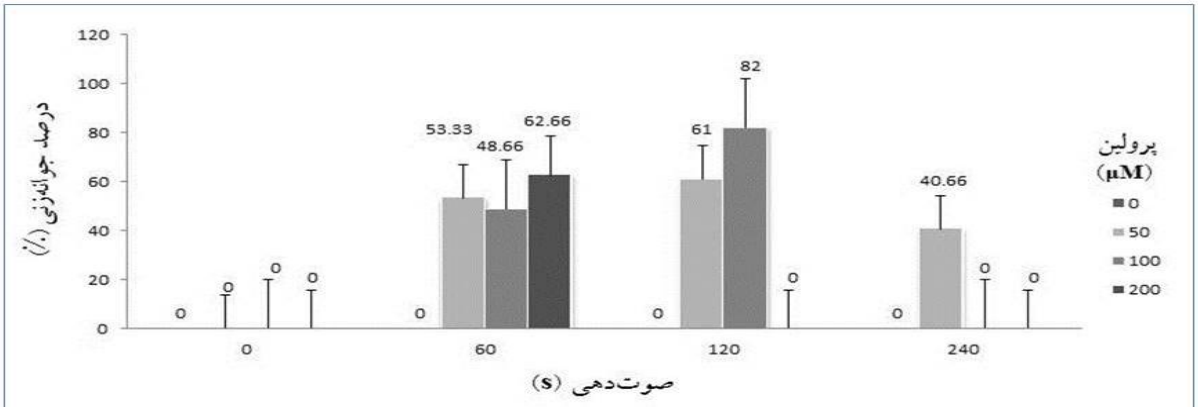
نمودار (۳). اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر وزن خشک کالوس انگور رقم کندری



نمودار (۴). اثر امواج فراصوت و پرولین بر میانگین تعداد جنین در هر کالوس

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار (۵). اثر متقابل امواج فراصوت و پرولین بر درصد جوانه‌زنی جنین

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی می‌توان گفت که امواج فرصوت در حضور یک منبع نیتروژنی توانسته است ویژگی‌های مرتبط با جنین‌زایی بدنی و متعاقبا جوانه‌زنی جنین‌ها را افزایش دهد. به نظر می‌رسد که نقش این امواج در افزایش جوانه‌زنی بذرها تنها محدود به نقش آنها در افزایش آبگیری بذر نمی‌شود بلکه احتمالا افزایش فعالیت آنزیمی و افزایش سرعت ملکول‌ها از دیگر دلایل این پدیده باشد که نیاز به مطالعات دقیق‌تر دارد. این آزمایش نخستین گزارش از اثر امواج فراصوت بر جوانه‌زنی جنین‌های بدنی است.

منابع

جمال محمود ا.، ع. عبادی، م. امیدی، م. میرمعصومی، 1391. تاثیر غلظت‌های مختلف ساکارز، کازئین هیدرولایزات واسیدهای آمینه مختلف بر جنین‌زایی سوماتیکی در برخی از ارقام انگور (Vitis vinifera L.). مجله پژوهش‌های تولید گیاهی.20 :157-170.

رضایی آ. و ی. فرخزاد، 1394. اثر امواج فراصوت در کشت بافت گیاهی. دومین کنفرانس بین‌المللی یافته‌های نوین در کشاورزی. 15 اسفند 1394. پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست دانشگاه تهران. تهران.

Bennici, A., M. Anzidei, and G. G. Vendramin. 2004. Genetic stability and uniformity of Foeniculum vulgare Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant Sci, 166 (1): 221-227.

Kantharajah, A. S. and P. G. Golegaonkar. 2003. Review: somatic embryogenesis in eggplant. Sci. Hortic, 1-11.

Lea, P. J., 1993. Nitrogen metabolism. In: Lea., P. J., Leegood, RC. (eds). Plant biochemistry and molecular biology. Wiley, New York, Pp: 155-180.

Manoj, K., V. S. Jaiswal, and U. Jaiswal. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (Psidium guajava L.). Sci Hort, 121: 233-236.

Martinelli, L. and I. Gribaudo. 2001. Soamtic embryogenesis in grapevine, pp. 327-351. In K. A. Roubelakis-Angelakis (ed.). Molecular Biology & biotechnology of the grapevine. Kluwer Academic publishers. Netherlands.

Nidez, R. P., 1994. Growth of embryogenic sweet orange callus on media varing in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. Plant Cell Tissue Organ Cult, 39: 1-5.

Nieves, N., F. Sagarra, R. Gonzalez, Y. Lezcano, M. Cid, M. A. Blanco, and Castillo, R. 2008. Effect of exogenous arginine on sugarcane (Saccharum sp.) somatic embryogenesis, free polyamines and the contents of the soluble proteins and proline. Plant Cell Tiss Organ Cult, 95: 313-320.

www.SID.ir

Archive of SID

Ozkum, D., Tipirdamaz, R. 2011. Effects of L-proline and cold treatment on pepper (Capsicum annuum L.) anther culture. Survival and Susyainability Environment Earth Science, 137-143.

The effect of proline and ultrasound on callus induction and somatic embryogenesis from explants internode stem cultivar "Kondori"

Y. Farrokhzad, A. Rezaei, Y. Sharafi, I. Rohollahi
1- M. Sc of Horticultural Science, Shahed University, Tehran-Iran
2,3 and 4- Dept. of Horticultural Science, Shahed University, Tehran- Iran.
*Corresponding author

Abstract
The main purpose of the study was to investigate the effect of ultrasound at four time (without treatment, 60, 120, 240) and proline at four levels (without treatment, 50, 100, 200 mM) on somatic embryogenesis and embryo germination of grape cv "Kondori" from internode stem explants. After sterilization of explants were cultured on MS medium and then obtained callus was transferred to MS medium supplemented with proline. Ultrasound treatment is also applied at this stage. Obtained embryos were cultivated to germinate on MS medium without auxin. Sonication treatment was applied again at this stage. Characteristics such as frequency of callogenesis, fresh and dry weight of callus, number of embryos per callus, embryo germination were evaluated. The results showed that ultrasound and proline the studied indexes had a significant effect on the level of one percent. In general, the levels of 50 and 100 mM proline and 60 and 120 seconds sonication respectively, were the most positive impact on the most of indicess.
Keywords: Ultrasound, Sonication, Proline, Somatic embryogenesis and germination

www.SID.ir